



TITLE:

組織培養法による骨巨細胞腫の研究

AUTHOR(S):

藤原, 祐三

CITATION:

藤原, 祐三. 組織培養法による骨巨細胞腫の研究. 日本外科宝函 1967, 36(6): 803-818

ISSUE DATE:

1967-11-01

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/207415>

RIGHT:

組織培養法による骨巨細胞腫の研究

京都大学医学部整形外科教室（指導：伊藤鉄夫教授）

藤 原 祐 三

〔原稿受付：昭和42年8月1日〕

Tissue Culture Study on the Giant-cell Tumor of Bone

by

YUZO FUJIWARA

From the Department of Orthopedic Surgery, Kyoto University Medical School

(Director : Prof. Dr. TETSUO Iro)

Tissue culture study of giant cell tumor of bone was undertaken. Twelve tumors were used for study. In nine cases out of them, cultivation was successfully carried out, for one generation in all except for one. In remaining one tumor, continuous culture for 12 generations (253 days) was successfully carried out. From these study, the following results were obtained.

1) In tissue culture of giant cell tumor of bone, multinuclear giant cells were gradually degenerated within 12 days in all cases. Even in case in which continuous culture was successfully carried out for 12 generations, the giant cells were disappeared during the first generation, and the mononuclear cells were exclusively cultivated for the subsequent 11 generations.

2) Giant cells, however, showed a vigorous wandering at the beginning of the first generation. This fact suggests that the giant cells are in highly differentiated state and never in the progress of regressive degeneration in vivo.

3) Morphological character of the giant cells in the culture medium suggested that they have their origin in osteoblast.

4) There were some evidences that the giant cells were formed by fusion of the small mononuclear cells.

5) Giant cells were classified into two types depending on their activity. The first type of giant cell showed a vigorous wandering, and, moreover, many small mononuclear cells were arranged in the shape of ring around it. The second type of giant cell showed neither active movement nor characteristic arrangement of the mononuclear cells around it.

目 次

I 緒 論	2 基質細胞と多核巨細胞との関係
II 実験材料及び実験方法	3 培養所見と組織学的所見との関係
III 実験成績	4 2～3の例について
1 多核巨細胞の形態学的変化	(i) No. 3例

(ii) No. 7例

IV 考 察

1 培養条件について

2 培養所見について

V 結 論

VI 参 考 文 献

I. 緒 論

近年、組織培養法が著しく進歩し各種の腫瘍についても、本法を用いた研究が相次いで発表されている。特に自律性を得て分裂増殖する腫瘍細胞の形態学的変化が経時的に観察され、又培養条件が容易に調節出来るために、これを人為的に種々変化せしめ、その際に生ずる腫瘍細胞の変化なども観察されている。このような観察と基礎として、各種瘍の本態、特に組織発生について種々議論されている。

一方、骨腫瘍は他の一般臓器腫瘍に比して組織培養が困難なために、報告例は比較的少かつたが、近年になつて特に 骨巨細胞腫については、Gey, Morton, Schajowicz, 阿部, 太田等の研究が相次いで報告されている。骨腫瘍の中でも、骨巨細胞腫は比較的組織培養に成功し易く、且つ材料も入手しやすいという理由によると考えられるが、しかし、これらの研究では、培養細胞の形態学的観察が経時的に詳しく行なわれていない。

著者は、1964年3月以来、41例の骨腫瘍について組織培養を試みた。骨巨細胞腫はこのうち11例で、9例において初代培養に成功した。これらについて培養細胞の形態学的な観察を行ない、多核巨細胞の時間的経過による変化、基質細胞と多核巨細胞との関係、各症例における培養所見の相違及びこれと組織学的所見との関係などについて興味ある知見を得た。

II. 実験材料及び実験方法

実験材料は、1964年3月から1966年9月までの間に京都大学医学部附属病院整形外科で治療をうけた41例の骨腫瘍である。本論文では比較的確実な培養成績を得た 骨巨細胞腫の11例について、特に検討を加えた (Table I, II)。

Table I

Tumors	Numbers of explantation	Emigration
Osteoid osteoma	1	0
Enchondroma	2	0
Reticulum-cell sarcoma	1	1
Mesenchymoma	1	0
Giant-cell tumor	11	9
Fibrosarcoma	1	0
Osteogenic sarcoma	18	2
Metastatic cancer	6	0
Total	41	12

培養方法は最初の3例には回転培養法を用い、残り8例には trypsin 消化法による単層静置培養法を用いた。前者では、約1mm立方に細切した組織片を5×12mmの cover slip に、ニワトリ血漿で包埋し、その cover slip を、約2ccの培養液を注入した試験管に挿入して密栓を施したのち、この試験管を1時間に12回転の割合

Table II

Patient No.	Sex	Age	Site of the tumor	Time of continuous culture (days)
1	Female	18	Sacrum	no
2	Female	32	Upper end of the tibia	1-21
3	Female	55	Upper end of the tibia	1-10
4	Male	28	Lower end of the femur	6-41
5	Male	32	Lower end of the radius	1-11
6	Female	15	Upper end of the tibia	2-26
7	Male	20	Lower end of the femur	12-253
8	Male	20	Lower end of the femur	4-123
9	Female	27	Lower end of the femur	no
10	Female	30	Upper end of the fibula	1-42
11	Male	59	Upper end of the femur	1-26

合で回転するドラムに納めた。後者では、細切した組織片を trypsin 溶液で消化し、遊離した細胞を1分間に1000回転の速さで5分間遠沈し、培養液1ccに 20×10^4 個の細胞を再浮遊させた。培養液は、基礎培地としてEagle氏液を用い、これにコウシ血清を20%、鶏胚抽出液を5%の割合に混じ、pHの調整には NaHCO_3 を用いた。次に使用した培地、溶液について簡単にのべる。

(i) Eagle氏液

Difco社製の10倍液を購入し、滅菌した再蒸留水で希釈して用いた。

(ii) コウシ血清

コウシ血液より血清を分離し、 56°C に30分間加温して非働化したのち、Seitz濾過器で濾過滅菌し、 -20°C に凍結し保存した。

(iii) 鶏胚抽出液

孵化10日目の鶏卵より胚を無菌的に取り出し、これを圧搾して得た液を1分間3000回転で30分間遠沈し、その上清を -20°C に凍結したのち、 37°C の温浴内で融解する。この凍結、融解の操作を計3回繰り返して抽出液中にある細胞を全て破壊し、これを -20°C に凍結して保存した。

(iv) ニワトリ血漿

生後1年以内のオスのニワトリの翼下静脈を穿刺し、 0.1mg/cc のヘパリン溶液1ccに対し約20ccのニワトリ血液を採取し、これを3000回転/毎分で約5分間遠沈して血漿を分離し、これを 4°C の冷蔵庫に保存した。

(v) NaHCO_3 溶液

pH調整のために、市販のメイロン(7% NaHCO_3 溶液、大塚製薬製)を用いた。

(vi) Trypsin溶液

Trypsin溶液として、Caイオン、Mgイオンを含めぬ磷酸緩衝溶液に trypsin を0.25%の割合に溶解した溶液を用いた。Seitz濾過器で濾過滅菌し、これを 4°C の冷蔵庫に保存した。

培養液の交換は、細胞数と培養液量との関係や細胞の发育速度等によつて多少の差はあつたが、遅くとも5日に1回は行なつた。培養瓶には密栓を施しておいた。孵卵器内の温度は終始 37°C に保つた。

観察方法は、位相差顕微鏡で培養状態を観察する方法のほか、培養瓶中に挿入した cover slip を適宜とりだし Giemsa 染色を行なつて観察する方法も併せ用いた。

III. 実験成績

骨腫瘍41例について組織培養を試みたが、そのうち reticulum-cell sarcoma の1例と osteogenic sarcoma の2例及び giant-cell tumor の9例において初代培養に成功した。Osteogenic sarcoma は18例について組織培養を試みたにかかわらず、ようやく2例において初代培養に成功しただけであるのに反し、giant-cell tumor では、11例中9例に成功し、しかも1例においては継代培養することが出来、最高12代253日間にも達した。

その他、osteoid osteoma, enchondroma, mesenchymoma, fibrosarcoma, metastatic cancer についても組織培養を試みたが、これらでは初代培養に成功したものは1例もなかつた (Table I, II)。

骨巨細胞腫の組織培養所見

1 多核巨細胞の形態学的変化

分離培養後1~2時間で多核巨細胞の遊走が認められる。即ち、多数の偽足を不規則に出し、2乃至3個の分葉に分れていて、各分葉にはそれぞれ多数の核が認められる。原形質の周辺部には無数の糸状突起が認められ、破骨細胞にみられる所謂 brush border の如き像を示している。又、原形質の突起とは別に1乃至2個の基質細胞由来と考えられる単核細胞がこの多核細胞と連絡していることがあり、これはすみやかに多核細胞と融合する (Fig. 1)。多核巨細胞の原形質は比較的多く、Giemsa 染色では淡赤色に染まる。多数の核の周囲には原形質に細顆粒が認められ、又小さな空胞形成もときに認められる。核は略円形を呈し、概ね細胞の中央部に密集し、その数は数個から数十個に及ぶ。この核の形、大きさは基質細胞由来と考えられる単核細胞の核とよく似ているが、多核巨細胞の核には有糸分裂像が認められず、常に1乃至3個の核小体が認められる。

時間の経過とともに、この多核巨細胞は漸次偽足を失つて、多数の核が中央部に集まる。個々の多核巨細胞によつて多少の差異はあるが、多くは分離培養後2日間でこのような状態を呈するようになり、その後2乃至10日間この状態が持続する (Fig. 2)。

ついで多核巨細胞の原形質に多数の空胞形成がみられるようになり、細胞は全体として小さくなる。多数の核も濃縮、融解する。このように分離培養後7乃至14日て、殆ど全ての多核巨細胞は死滅し、この時期になつて旺盛な増殖を示す単核細胞の間に埋没する (Fig. 3, 4)。初代培養にみられる多核巨細胞の全て

がこのような経過を示すのではなく、分離培養当初から、既に Fig 2, 3, 4 のような形態を示しているものも多い。

初代培養に認められる多核巨細胞は、分離培養後約2週間で、殆んど全て死滅し、時にこれより長期間生存するものがあつても、継代培養することができない。そして、以後単核細胞の継代培養を続けても、初代培養に認められた活潑な遊走を示し、形態的にも整った多核細胞は再び認められなかつた。

2 基質細胞と多核巨細胞との関係

基質細胞に由来すると考えられる細胞の多くは単核で、ときに2乃至3個の核を有することもある。核の形は円形又は楕円形で、普通は1乃至2個の核小体を有している。又有糸分裂像も多く認められる。核周囲には原形質に細顆粒が多数認められる。細胞は全体として線維芽細胞様 (fibroblastic) の遊走型を示す。この種の細胞の遊走は多核巨細胞よりも遅く、分離培養後約2乃至3時間で始る (Fig. 5)。

電子顕微鏡による骨巨細胞腫の観察では、基質細胞に2種類の細胞を区別している人もあるが、著者の行なつた組織培養においては、上記の基質細胞由来と考えられる細胞に2種類を分つことは、形態学的には不可能であつた。

基質細胞由来と考えられる多くの単核細胞は培養3日目頃から分裂増殖を始めるが、同じ時期に、活潑に遊走していた多核巨細胞は漸次偽足を失ない、分葉も認められなくなり、細胞は全体として略円形を呈するようになる。この円形となつた多核巨細胞の周囲には、分裂増殖した単核細胞が環状に排列する (Fig. 6)。しかし、培養当初に活潑な遊走状態を示さなかつた多核巨細胞の周囲には、上記のような単核細胞の環状排列は認められず、多核巨細胞と単核細胞の間には特別な関係は認められない (Fig. 7)。

単核細胞は増殖して数を増し、一方多核巨細胞の変性は進行するので多核巨細胞の周囲にみられた単核細胞の環状排列は乱れ、分離培養後10乃至14日目頃には殆んど全ての多核巨細胞は単核細胞の間に埋没する。

3 培養所見と組織学的所見との関係

骨巨細胞腫の組織培養を行なつた結果、下記のような所見を規準として骨巨細胞腫を2種類に大別出来ることがわかつた。即ち、活潑に遊走する多核巨細胞が多くみられ、従つてその周囲に単核細胞が環状に排列するもの-A型と名づける一と、多核巨細胞の著しい遊走がみられず、最初から変性が著しく、従つて多核

巨細胞と単核細胞との間特別な関係の認められないもの-B型と名づける一との2種類である。これら2種類の差異は活潑に遊走する多核巨細胞の数の多少に関係しており、本質的な差異は認められないのであるが、実際にはかなり明白な対照を示している。

初代培養に失敗した2例及び術前に抗癌剤の局所的投与を長期間行なつた1例を除き、残りの8例について上記の分類を行なつてみると、Table III に示すように、A型には No. 5, 6, 7, 8 の4例が、B型には No. 2, 3, 4, 11 の4例が属する。Jaffe, Lichtenstein and Portis は巨細胞腫を組織学的に分類し、3型に分けているが、彼らの組織学的分類と培養所見による上記の分類とを対比してみると、組織学的にⅠ度であつた No. 7はA型に属し、組織学的にⅡ度であつたもののうちでNo. 5, 6, 8はA型に、No. 2, 4, 11はB型に属している。そして組織学的にⅢ度であつた No. 3はB型に属する (Fig. 8, 9, 10, 11)。

Table III

Patient No.	Histological findings	Findings in tissue culture
2.	Ⅱ	B
3.	Ⅲ	B
4.	Ⅱ	B
5.	Ⅱ	A
6.	Ⅱ	A
7.	Ⅰ	A
8.	Ⅱ	A
11.	Ⅱ	B

No. 1 and No. 10=tissue culture failed

No. 9=anti-neoplastic agent was locally infused before operation

4 2・3の例について

(i) No. 3例 (Fig. 9, 12)

組織学的には Jaffe らの3度に属し、基質細胞は異型性が強く細胞数が多い。多核巨細胞の形は不整で小さく核数も少ない。又多核巨細胞の数も少ない。

組織培養上の著しい特徴は多核巨細胞が認められないことである。これは活潑な遊走状態にあるものだけでなく変性過程にある多核巨細胞も認められないことを示している。しかし単核細胞には特別の所見が得られなかつた。

(ii) No. 7 (Fig. 3, 6, 13, 14, 15)

組織学的には Jaffe らの1度に属し、培養上はA型を示した例である。この例は著者の行つた継代培養例

中もつとも長期間継代培養をすることが出来た例である。その期間は12代253日で、Table IV のような経過をとつた。この場合も多核巨細胞は前述のような経過をとつて初代培養において殆んど消失した。7代118日目頃までは細胞の増殖も順調であつたが、以後継代による細胞数の減少が著しく、これに加えて細胞の増殖能が著しく衰え、遂に13代目の継代に失敗して細胞は死滅した。

Table IV

Generation number	Days of tissue culture (total)
1.	8 (8)
2.	20 (28)
3.	20 (48)
4.	22 (70)
5.	18 (88)
6.	17 (105)
7.	13 (118)
8.	31 (149)
9.	22 (171)
10.	27 (198)
11.	28 (226)
12.	27 (253)

細胞数の増加が順調であつた期間には、細胞の形態も略均一化し、線維芽細胞様の遊走型を示していたが、8代目以後細胞の増殖能が低下してからは、アメーバ様の遊走型を示す稍大型の細胞が出現し始めた。この細胞は2乃至3個の核を有し原形質が比較的多く偽足を四方に出している。このような細胞が漸次多くの部分を占めるようになり、遂に死滅した。太田や高瀬らの報告にあるような aggregation, 線維芽細胞様の遊走型から上皮細胞様への変化は認められず、細胞の形態学的均一化も起らず、細胞形態はむしろ多様化して漸次生活能を失つていった。

IV. 考 察

1 培養条件について

組織培養に際し培養液の組成の一つとして血清又は血清成分が一般的には必須であるとされている。勝田らによると血清はその物理化学的性質の故に必要なのであつて、このことは培養液中に占める血清成分の多くの部分を他の合成高分子化合物、例えば Polyvinyl-Pyrrolidone 等で置換できることから証明され

ると述べている。又、Fischer, Liebermann and Ove, Weiss 等は細胞がガラス面に接着し遊走するために血清が必要であるとし、特に Fischer らはコウシ血清蛋白の α_1 グロブリンを多く含む分画が HeLa 細胞のガラス面接着及び遊走を促進することを見出し、この分画が胎生期のコウシ血清に多いことから Fetuin と名づけている。同様に Weiss らは血清中の蛋白の多い分画が細胞のガラス面接着に必要な要素で、トリプシン処理により失われた細胞の接着性が培地にこの分画を加えることにより回復すると述べている。一方、Taylor によると、ヒト結膜由来細胞の培養に際しウマ、ニワトリの血清やフィブリノーゲンが細胞のガラス面接着遊走を遅らせ、これらの高分子を含まぬ Eagle 氏液を用いたときに細胞のガラス面接着が良く、ニワトリ胚やハツカネズミから新しく分離された細胞についても同じことが云えるという。

Fischer, White をはじめ多くの人々は血清に含まれる成分を詳細に研究し、人工的に合成された化合物のみで血清にかわるべきものを作製すべく努力した結果、現在では特定の細胞の生命維持に成功している。しかしあらゆる点で血清に匹敵するような合成培地という段階には猶到達していない。即ち、一部には血清が培養上細胞の発育に対し阻害的に作用するという報告があるものの、猶、血清が細胞の生育に不可欠であるとする意見が多い。

次に用いる血清の種類、つまり自家血清、同種血清、異種血清のうちいずれを用いるかの問題について Cobb and Walker. は、ヒトの正常細胞及び腫瘍細胞の培養では、自家血清が最も良い成績をもたらし、抗癌剤を培地に加えてもその影響をうけにくいと述べている。太田はヒト骨腫瘍の組織培養を行なう際、自家血清、同種血清及びコウシ血清を用いて比較検討し、コウシ血清において良い成績を得たと述べている。太田の成績は一見矛盾しているようであるが、同様のことは著者の予備実験でも認められた。即ち、自家血清、同種血清及びコウシ血清のうちでは、コウシ血清つまり異種血清において最も良い成績が得られた。勿論、極く少数例では、自家血清の成績も秀れていたが、安定した成績を得るという点ではコウシ血清には及ばなかつた。

著者の行なつた予備実験の成績からみると、培地に含まれる血清の意義は単に物理化学的な性質だけに存するのではなく、このほかに、血清は細胞の発育に必要な何らかの物質を含んでいて、これが細胞を生体外

で培養するという特殊な条件下で大きな役割を果たしているものと思われる。又、ヒト骨腫瘍の組織培養に際し、異種血清であるコウシ血清において安定した成績をあげることができたことは一見矛盾しているように思われる。これは恐らく成熟動物の血清中にしばしば細胞毒が含まれていることに原因があると考えられる。著者はこれらの点を考慮して終始コウシ血清を用いた。

培地の大部分を占める基礎培地について、著者は下記の三種類を用いて予備実験を行なった。

i. TC-Medium No. 199 (Morgan, Morton and Parker)

ii. Eagle's solution

iii. Hanks' solution にラクトアルブミン水解物とイースト菌抽出物とを添加したもの。

これらはいずれも化学的に既知の成分から成る培地又は血清を含め培地を作製する目的で考案されたものである。しかし著者の行なつた実験では、いずれも血清を必要とし、コウシ血清を用いたことは既述の通りである。血清を用いた場合、上記の3者を比較すると、TC-Medium No. 199 と Eagle's solution との間には余り差がなく、良い成績が得られた。Hanks' solution に添加した培地は、稍成績が悪かつた。前2者の場合でも、骨腫瘍の培養に必要な成分でありながら含まれていなかったり、特に必要ではないか又は不必要であるのに含まれている成分が欠けるのであろうが、現在の段階では、具体的にそれが何であるかは不明である。従つていずれを用いるべきかについて理論的な根拠はない。

鶏胚抽出液は従来 発育促進因子を含んでいるとされ、好んで組織培養に用いられているもので、著者もこれを5%の割合に培地に加えたが、この因子が何であるかは未だ究明されていない。著者の行なつた実験では、分離培養時及び継代培養時に鶏胚抽出液を添加することが良い成績をもたらした。しかし Hull, Graf and McCarty, Ely and Gray によると、ハツカネズミ腹水癌の組織培養では、鶏胚抽出液が細胞の発育を阻害するという結果が出ており、必ずしも発育促進因子のみを含むものではないと考えられる。

その他、培養温度の問題、気相中の酸素や炭酸ガスの濃度の問題、培養方法の問題など、非常に複雑でしかも重要な問題が多い。例えば、Sandström によると、肝臓組織の培養を種々の方法で行なつたところ、発育する細胞の形態や発育の様相がそれぞれに異なる

ことが示されている。即ち培養方法によつて、肝臓組織構成細胞のうち旺盛な発育をする細胞が異なることも考えられるし、或いは同一の細胞が培養方法によつて異なつた発育をとげることも考えられる。

上記のように組織培養を行なうに際しては非常に多くの条件について検討を加えることが必要であり、その条件の各々が非常に困難な問題点を有している。これらの条件を種々検討した結果では、著者の行なつた組織培養の条件は妥当なものであつたと考えられる。

2 培養所見について

著者の行なつた組織培養では、骨巨細胞腫において成功率が高く、他の骨腫瘍では成績がよくない。Gey は骨巨細胞腫のほか fibrosarcoma, chondrosarcoma, Ewing's tumor, multiple myeloma 等の組織培養に成功しているが、どの程度の成功率であつたかについては記していない。太田の研究では、骨巨細胞腫において組織培養に成功し易いことが示されているし、高瀬らも同様の傾向を認めているようである。

一般的に、幼若細胞や悪性度の高い腫瘍細胞の培養は比較的容易だとされ、これに反して良性腫瘍の組織培養は困難とされている。それにもかかわらず比較的良性とされている骨巨細胞腫の組織培養に比較的良好な成績が得られ、これよりも悪性である骨肉腫の培養成績が悪い。この点について論じている人はないが、著者は恐らく次のようなことも大きく影響しているであろうと考える。つまり、大部分の骨腫瘍では細胞間物質が多く、従つて遊離した細胞となり難く遊走が妨げられ、培養成績がよくないのであろう。勿論、培地やその他の条件についても研究改良の余地は残されていると考えられる。

1940年、Jaffe, Lichtenstein and Portis が骨巨細胞腫としての entity を確立してより現在に至るまで、本腫瘍の組織発生特に多核巨細胞の組織発生について多くの議論が行なわれ、内皮細胞、組織球、単球、骨髄巨核球、異物巨細胞、骨芽細胞、破骨細胞等種々の説がみられる。しかし最近では、破骨細胞との近縁関係を立証するような研究発表が多い。即ち、組織学的にみられる破骨細胞と骨巨細胞腫にみられる多核巨細胞との形態学的な類似性のほかに、Schajowicz は組織化学的方法を用いて、両者が酵素活性においても極めて類似しており、両者が組織発生的に近い関係にあるとのべている。又、一連の電子顕微鏡的研究においても、多核巨細胞と破骨細胞との類似性が認められているようである。

組織培養による研究についてみると、1946年、Hancox はニワトリ胚の前頭骨の組織培養を血漿包埋法で行ない、破骨細胞を観察しているが、これによると破骨細胞は plasma clot を融解しつつ活潑に遊走し、組織片周囲に遊走している紡錘形細胞の外側にも及んでいる。細胞質は細顆粒を有し、酸好性、不規則な形の偽足を有する。又、2乃至3個の分葉に分れ、各分葉は細い filament で連つていて、夫々に多数の核を有する。この細胞は培養開始後48時間で変性を起し始め、漸次細胞質は粗な網目状を呈して空胞を形成し、核は濃縮し融解すると述べている。

著者の観察した骨巨細胞腫の多核巨細胞も、前述のように不規則な偽足を有して活潑に遊走し、2乃至3個の分葉に分れて、夫々に多数の核を有する。ときには紡錘形細胞と原形質の連絡を有し、漸次これを吸収融合する。このように多核巨細胞は活潑な機能状態にあると考えられ、単に変性しつつある状態の細胞とは考えられない。従つて何らかの意味で高度に分化した細胞なのであろう。このような形態学的所見のほかに、培養所見の時間的経過は Hancox の記載している破骨細胞のそれと非常に良く一致している。恐らく両者は近い関係にあるものと推測される。

多核巨細胞の成立機転については3つの仮説がある。即ち細胞質の分裂を伴わぬ核分裂の繰返しによるもの、単核細胞の融合によるもの、又多核巨細胞そのものの分裂増殖によるものとする仮説である。これらのうち、単核細胞の融合によつて多核巨細胞が生ずるという仮説は多くの人々により支持されており、組織培養法により骨巨細胞腫の研究を行なつた Morton, Schajowicz, 太田等もこれを支持している。著者の実験においても、多核巨細胞と単核細胞との間に原形質の連絡が認められ、これが多核巨細胞に吸収されることから、恐らく基質細胞の融合によつて多核巨細胞が生ずるものと考えられる。

尚、著者が行なつた骨巨細胞腫の組織培養のうち、長期間継代培養することができた例を詳しく観察すると、培養当初にみられた多核巨細胞は3日目頃から変性し始め10乃至14日後には完全に死滅した。それ以後には、このような多核巨細胞を認めることは出来ず、主として単核の紡錘形細胞となる。しかし、ときにはこれらの中に2乃至3核をもつた稍大型の細胞が認められ、これが培養条件によつては更に近隣の単核細胞と融合して、培養当初にみられたと同じような多核巨細胞にまで発育するものと考えられる (Fig. 16)。こ

こにみられる2乃至3核の細胞は、高瀬らの述べているようなX線照射や抗癌剤添加によつて生ずる多核細胞や Mitamura の述べていうウシのアルブミン添加によつて生ずる多核細胞の如くいわば退行変性の過程にある細胞とは全く別のものと考えられる。

著者は初代培養に際して得られた形態学的所見を基礎として、骨巨細胞腫をA, Bの2型に分類した。骨巨細胞腫にみられる多核巨細胞は、基質細胞の融合によつて生じ、これは一段と分化の進んだ状態である。基質細胞が多数融合し、分化し成熟した多核巨細胞を形成する傾向の強い例では、組織培養上活潑に遊走する多核巨細胞が認められ、従つてA型を示し、反対に分化成熟した多核巨細胞を形成する傾向の少ない例では、B型を示す。このような考え方によれば anaplasia を示すと考えられるB型の方がA型よりも悪性であることとなり、実際かなりの程度まで Jaffe らの組織学的分類と一致している。しかし、この分類法の基礎は活潑に遊走する成熟した多核巨細胞の量的な差異にあり、決して質的な差異を基礎としていない。従つてこの分類法が直ちに骨巨細胞腫の悪性度判定に応用出来るとは考えられない。

骨腫瘍の長期継代培養の報告としては、Carrel, Gey らの giant-cell tumor, osteogenic sarcoma fibrosarcoma, chondromyxosarcoma, Ewing's tumor の例や Morton, Schajowicz らの giant-cell tumor 例があり、我が国でも太田の giant-cell tumor, 高瀬らの osteogenic sarcoma 等の例がみられる。これらはいずれも数年にわたつて継代培養されており、細胞は無限の増殖能を有しているが如くである。

組織培養においては、一般に2乃至3代まで細胞の増殖が旺盛であるが、それより後は継代に際しての細胞数の減少が著しく、同時に増殖能力も低下して遂には死滅するものとされている。しかしこの間に何らかの要因が加わつて、細胞に新しい増殖能が与えられると、以後は無限に継代可能となる。太田や高瀬の述べているように、或る時期から急に細胞の増殖能が上昇したという事実がこれである。劣悪な条件下で淘汰が行われ、生存力の強い細胞ばかりが生き残るのか、或いは細胞に突然変異が起るのか、明確なことはわかっていない。

著者の実験例中1例に12代253日間の継代培養ができたが、結局上記のような無限の増殖能を獲得することなく死滅した。培地をはじめとし多数の培養条件について種々の工夫研究も要求されるところであり、又

培養手技の巧拙も問題になると思われる。

V. 結 論

1964年3月より1966年9月までの間に、京都大学医学部附属病院整形外科で治療を受けた骨腫瘍症例の41例につき組織培養を試みた。そのうち骨巨細胞腫は11例で、9例において初代培養に成功した。更にそのうちの1例では12代253日にわたって継代培養することができた。これらについて経時的形態学的観察を行なつて次の結論を得た。

1. 一般的に、骨巨細胞腫の組織培養に於ては、巨細胞は早期に変性に陥るものである。12代に亘る継代培養成功例に於ても、巨細胞は初代において見られただけで、その後の11代では専ら単核細胞だけが継代培養されたにすぎない。

2. 骨巨細胞腫にみられる多核巨細胞は、培養の初期には活潑に遊走する能力を有しており、高度に分化成熟した細胞であつて、変性過程にあるものではない。

3. この多核巨細胞の培養状態における形態学的性状は破骨細胞と組織発生的に近い関係にあることを推測させる。

4. 骨巨細胞腫において出現する多核巨細胞は基質細胞の融合により生ずると考えられる。

5. 症例により活潑に遊走する多核巨細胞に数的な差が認められ、これを基礎として骨巨細胞腫を2種類に分類することができる。活潑な遊走を示す巨細胞の周辺には、これをとりまいて多数の単核細胞群が環状に配列する像が認められた。非活動性の巨細胞の周辺には上記のような単核細胞の環状配列は認められなかった。この分類法は Jaffe らの悪性度に関する分類と略一致する。

終りに臨み、御指導、御校閲を賜つた恩師伊藤鉄夫教授に深く感謝致しますとともに、絶えず御指導、御鞭撻をいただきました赤星義彦助教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) 阿部光俊：組織培養法による巨細胞腫瘍の研究。日整会誌, 36 : 125, 1962.
- 2) 赤星義彦ほか：骨巨細胞腫の治療適応に関する2, 3の考察。中部整災誌, 9 : 233, 1966.
- 3) Barnicot, N. A. : The supravital staining of

osteoclasts with neutral-red : their distribution on the parietal bone of normal growing mice, and a comparison with the mutants grey-lethal and hydrocephalus-3. Proc. Roy. Soc. B-134 : 467, 1947.

- 4) Bourne, G. H. : The biochemistry and physiology of bone. Academic Press Inc., New York, 1956.
- 5) Carrel, A. and Burrows, M. T. : Human sarcoma cultivated outside of the body. J. A. M. A. 55 : 1732, 1910.
- 6) Cobb, J. P. and Walker, D. G. : A comparative study of the effects of heterologous, homologous, and autologous sera on human normal and malignant cells in primary short-term cultures. Excerpta Medica (Section I) 14 : 350, 1960.
- 7) Coley, B. L., Higinbotham, N. L. and Tatsumi, K. : Giantcell tumor of bone. Am. J. Surg. 96 : 479, 1958.
- 8) Eagle, H. : The specific amino acid requirements of mammalian cells (Strain L) in tissue culture. J. Biol. Chem. 214 : 839, 1955.
- 9) Eagle, H. : The specific amino-acid requirements of a human carcinoma cell (Strain HeLa) in tissue culture. J. Exp. Med. 102 37, 1955.
- 10) Eagle, H. : The minimum vitamin requirements of the L and HeLa cells in tissue culture, the production of specific vitamin deficiencies and their cure. J. Exp. Med. 102 : 595, 1955.
- 11) Ely, J. O. and Gray, J. H. : In vitro culture of the Krebs ascites carcinoma and the Ehrlich ascites carcinoma of mice. Cancer Res. 20 : 918, 1960.
- 12) Ewing, J. : A review and classification of bone sarcomas. Arch. Surg. 4 : 485, 1922.
- 13) Fischer, A., Astrup, T., Ehrensward, G. and Oehlenschläger, V. : Growth of animal tissue cells in artificial media. Proc. Soc. Exp. Biol. 67 : 40, 1948.
- 14) Fischer, H. E., Puck, T. T. and Sato, G. : Molecular growth requirements of single mam-

- malian cells. The action of fetuin in promoting cell attachment to glass. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **44** : 4, 1958.
- 15) Gey, G. O. and Gey, M. K. : The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture. *Am. J. Cancer* **27** : 45, 1936.
- 16) Gey, G. O., Coffman, W. D. and Kubick, M. T. : Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12** : 264, 1952.
- 17) Geschickter, C. F. and Copeland, M. M. : Tumors of bone. Ed. 3. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1949.
- 18) Graf, S. and McCarty, K. S. : Sustained cell culture. *Exper. Cell Res.* **13** : 348, 1957.
- 19) Hancox, N. M. : On the occurrence in vitro of cells resembling osteoclasts. *J. Physiol.* **105** : 66, 1946.
- 20) Hancox, N. M. : Motion picture observations on osteoclasts in vitro. *J. Physiol.* **110** : 205, 1949.
- 21) Healy, G. M., Fischer, D. C. and Parker, R. C. : Nutrition of animal cells in tissue culture. X. Synthetic medium No. 858. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **89** : 71, 1955.
- 22) Heller, M., McLean, F. C. and Bloom, W. : Cellular transformations in mammalian bones induced by parathyroid extract. *Am. J. Anat.* **87** : 315, 1950.
- 23) 堀江昭夫 : 良性骨巨細胞腫の巨細胞と基質細胞の電子顕微鏡的観察. *福岡医誌* **52** : 817, 1961.
- 24) 堀田進と大山昭夫 : 組織培養の基本と実際. 永井書店. 大阪, 1963.
- 25) Hull, R. N. : Establishing long-term cultures of mammalian normal, solid tumor, and ascites tumor cells on glass. *Science* **117** : 223, 1953.
- 26) 岩下奎一 : 骨巨細胞腫の電子顕微鏡的研究. *日整会誌*, **39** : 29, 1965.
- 27) Jaffe, H. L., Lichtenstein, L. and Portis, R. B. : Giant-cell tumor of bone. Its pathologic appearance, grading, supposed variants and treatment. *Arch. Pathol.* **30** : 993, 1940.
- 28) Jaffe, H. L. : Giant-cell reparative granuloma, traumatic bone cyst and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of the jaw bones. *Oral Surg., Oral Med. and Oral Surg., Oral Med. and Oral Pathol.* **6** : 159, 1953.
- 29) Jaffe, H. L. : Tumors and tumorous conditions of the bones and joints. Lea and Febiger, Philadelphia, 1958.
- 30) 勝田甫ほか : 正常及び腫瘍細胞の高分子要求—組織培養による検討. *細胞化学シンポジウム*, **10** : 91, 1961.
- 31) Koelliker, A. : Handbuch der Gewebelehre des Menschen. 6th. Ed. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 1889.
- 32) Kroon, D. B. : The bone-destroying function of the osteoclasts (Koelliker's "Brush Border"). *Acta Anat.* **21** : 1, 1954.
- 33) Lichtenstein, L. : Bone tumors. C. V. Mosby Company. St. Louis, 1959.
- 34) Lieberman, I. and Ove, P. : A protein growth factor for mammalian cells in culture. *J. Biol. Chem.* **233** : 637, 1958.
- 35) McQuilken, W. T., Evans, V. J. and Earle, W. R. : The adaptation of additional lines of NCTC clone 929 (Strain L) cells to chemically defined protein-free medium NCTC 109. *J. Nat. Cancer Inst.* **19** : 885, 1957.
- 36) Meyerding, H. W. and Broders, A. C. : Primary malignant giant-cell sarcoma of long bones. *Trans. Western Surg. Assn.* **51** : 76, 1942.
- 37) Mitamura, K. : Albumin fraction in bovine serum as an inducer of multinucleated cells in tissue culture of strain L cells (mouse fibroblasts). *Jap. J. Exper. Med.* **29** : 585, 1959.
- 38) Morgan, J. F., Morton, H. J. and Parker, R. C. : Nutrition of animal cells in tissue culture. 1. Initial studies on an synthetic medium. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* **73** : 1, 1950.
- 39) Morton, J. J. : Giant-cell tumor of bone. *Cancer* **9** : 1012, 1956.
- 40) 太田承一 : 骨腫瘍の組織培養について. (第1報). *日整会誌* **36** : 521, 1962.
- 41) Pace, D. M., Thompson, J. R. and Van Camp, W. A. : Effects of oxygen on growth in several established cell lines. *J. Nat. Cancer Inst.* **28** :

- 897, 1962.
- 42) Paul, J. : Cell and tissue culture. E. and S. Livingstone Ltd. Edinburgh and London, 1961.
- 43) Russell, D. S. : Malignant osteoclastoma. And the association of malignant osteoclastoma with Paget's osteitis deformans. J. Bone and Joint Surg. **31-B** : 281, 1949.
- 44) Sandström, B. : Studies on cells from liver tissue cultivated in vitro. I. Influence of the culture method on cell morphology and growth pattern. Exper. Cell Res. **37** : 552, 1965.
- 45) Schajowicz, F. : Giant-cell tumors of bone (Osteoclastoma). J. Bone and Joint Surg. **43-A** : 1, 1961.
- 46) Selawry, O. S., Goldstein, M. N. and McCormack, T. : Hyperthermia in tissue cultured cells of malignant origin. Cancer Res. **17** : 785, 1957.
- 47) Stewart, M. J. : Observations on Myeloid sarcoma, with an analysis of 50 cases. Lancet **2** : 1236, 1914.
- 48) Stewart, M. J. and Richardson, T. R. : Giant-cell tumor of bone. J. Bone and Joint Surg. **34-A** : 372, 1951.
- 49) 高瀬武平ほか：単層継代組織培養せる骨巨細胞腫に対するX線照射の影響について。中部整災誌 **7** : 126, 1964.
- 50) 高瀬武平ほか：組織培養法によるヒト骨肉腫の研究。中部整災誌 **7** : 577, 1964.
- 51) 武瀬武平ほか：組織培養法によるヒト骨肉腫由来細胞に及ぼすX線照射の影響。中部整災誌, **9** : 23, 1966.
- 52) Taylor, A. C. : Attachment and spreading of cells in tissue culture. Exper. Cell Res. Suppl. **8** : 154, 1961.
- 53) Trowell, O. A. : The culture of lymph nodes in synthetic media. Exper. Cell Res. **9** 285, 1955.
- 54) Waymouth, C. : Rapid proliferation of sublines of NCTC clone 929 (Strain L) mouse cells in a simple chemically defined medium (MB 752/1). J. Nat. Cancer Inst. **22** 1003, 1959.
- 55) Weiss, L. Studies on cellular adhesion in tissue culture. Exper. Cell Res. **17** : 499, 1959.
- 56) White, P. R. : Prolonged survival of excised animal tissue in vitro in nutrients of known constitution. J. Cell Comp. Physiol. **34** : 221, 1949.
- 57) Williams, R. R., Dahlin, D. C. and Ghormley, R. K. : Giantcell tumor of bone. Cancer **7** : 764, 1954.
- 58) Willis, R. A. : Pathology of osteoclastoma or giant-cell tumor of bone. J. Bone and Joint Surg. **31-B** : 236, 1949.



Fig. 1. 分離培養後24時間の多核巨細胞
No. 6. 位相差像 $\times 400$



Fig. 2. 分離培養後4日目の多核巨細胞
No. 4. 左: 位相差像 右: Giemsa 染色 $\times 100$

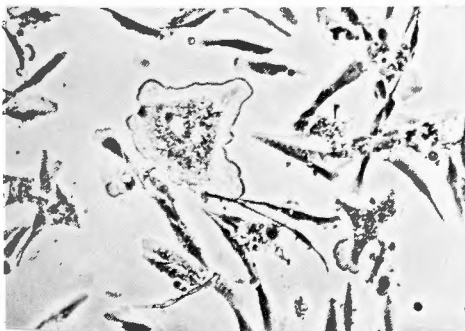


Fig. 3. 分離培養後9日目
No. 7. 位相差像 $\times 400$

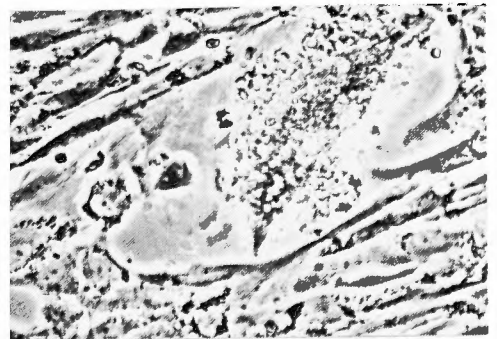


Fig. 4. 分離培養後12日目
No. 6. 位相差像 $\times 400$

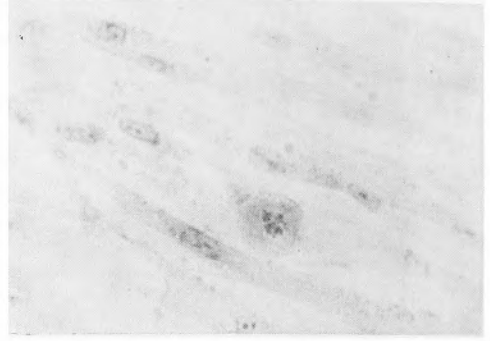
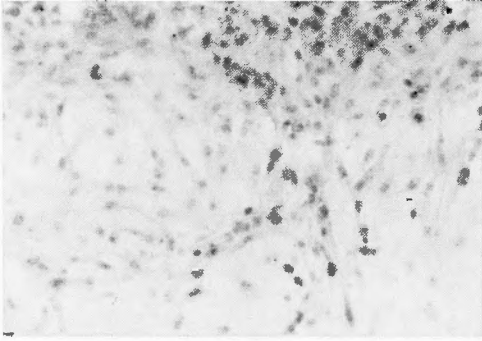


Fig. 5-1. 分離培養後4日目
No. 2. Giemsa 染色 左: $\times 100$, 右: $\times 400$

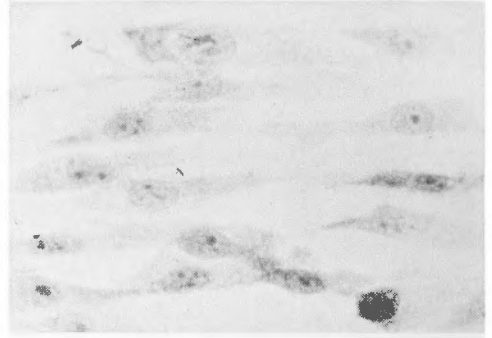
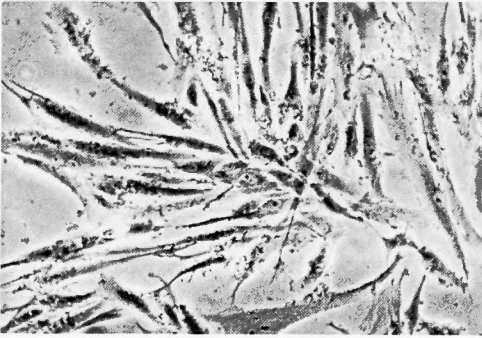


Fig. 5-2. 分離培養後5代35日目
No. 4. 左: 位相差像 $\times 200$, 右: Giemsa 染色 $\times 400$

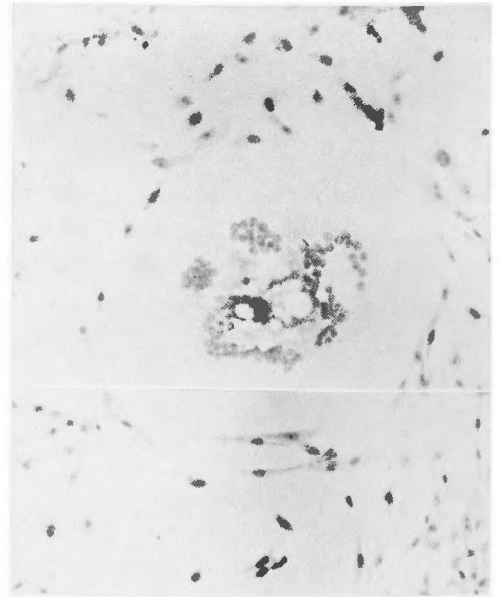
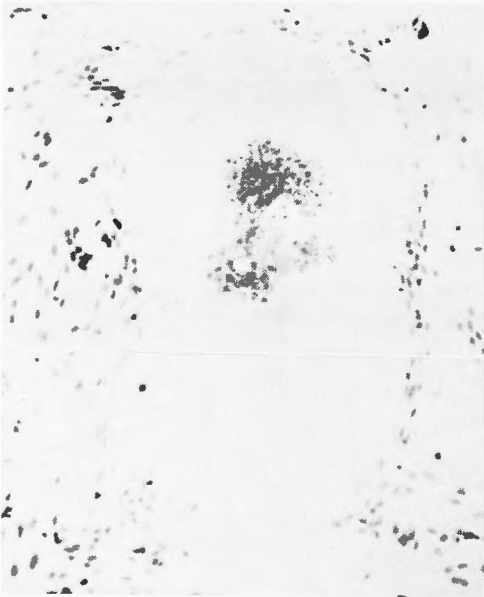


Fig. 6-1. 分離培養後3日目
No. 5. Giemsa染色 $\times 100$

Fig. 6-2. 分離培養後4日目
No. 7. Giemsa染色 $\times 100$

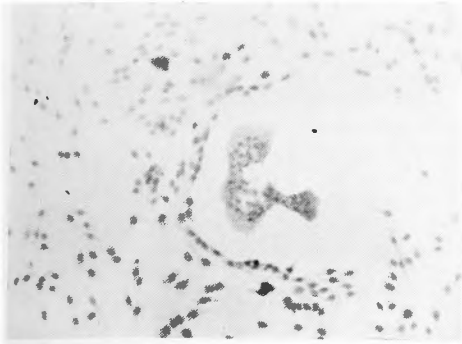


Fig. 6-3. 分離培養後4日目
No. 8. Giemsa染色 ×100

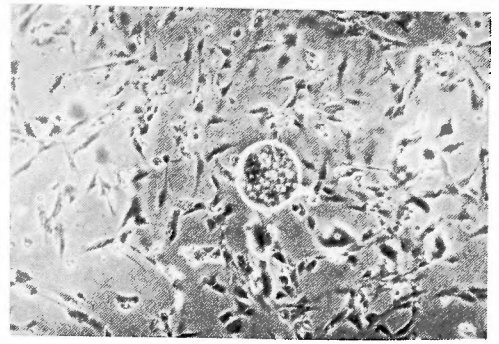


Fig. 7. 分離培養後2日目
No. 11. 位相差像 ×100

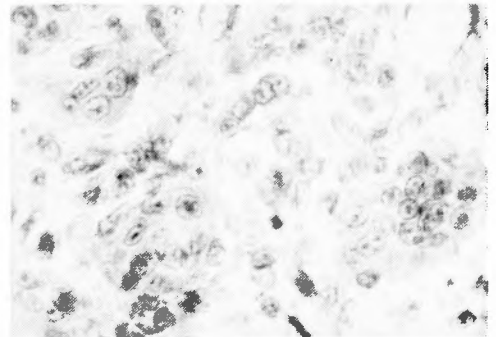
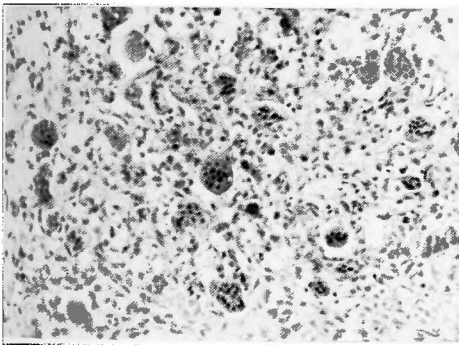


Fig. 8. 組織像
No. 2. Giemsa染色 左: ×100, 右: ×400

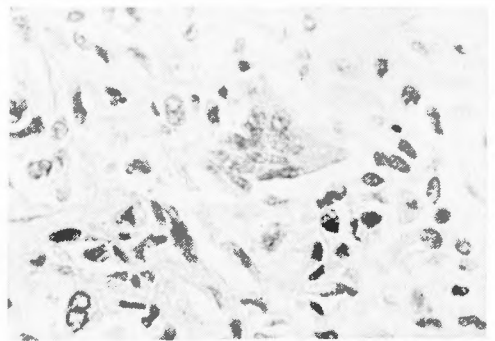
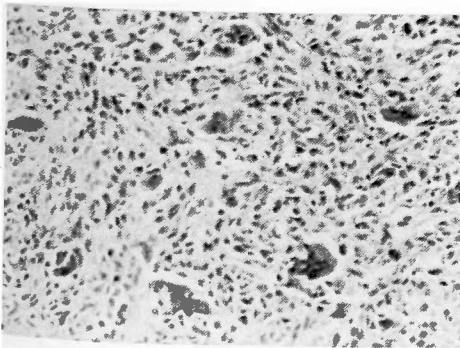


Fig. 9. 組織像
No. 3. Giemsa染色 左: ×100, 右: ×400

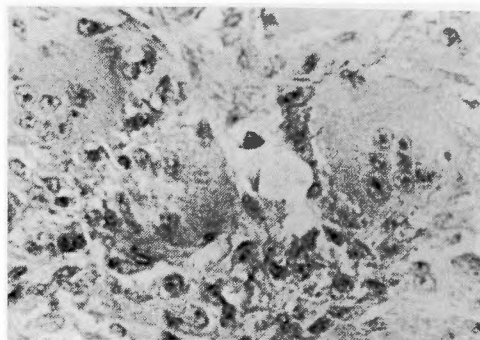
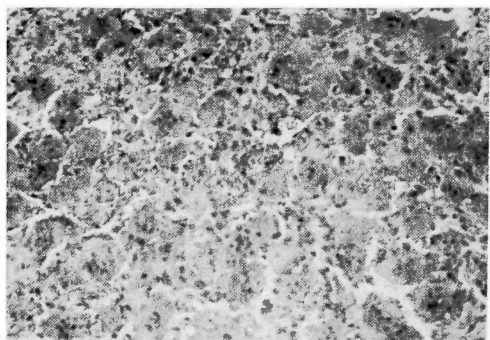


Fig. 10. 組 織 像
No. 7. Giemsa染色 左： $\times 100$, 右： $\times 400$

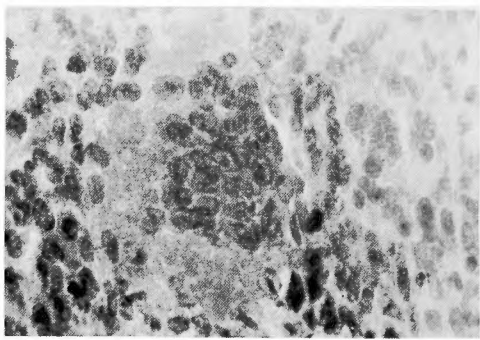
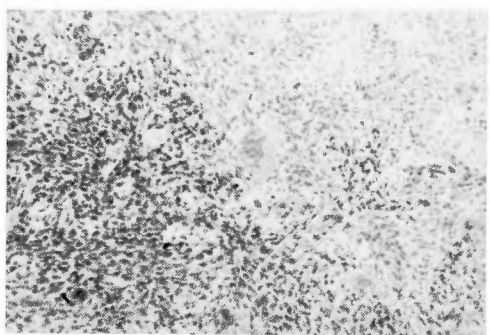


Fig. 11. 組 織 像
No. 5. Giemsa染色 左： $\times 100$, 右： $\times 400$



Fig. 12. 分離培養後24時間
No. 3. Giemsa染色 $\times 100$

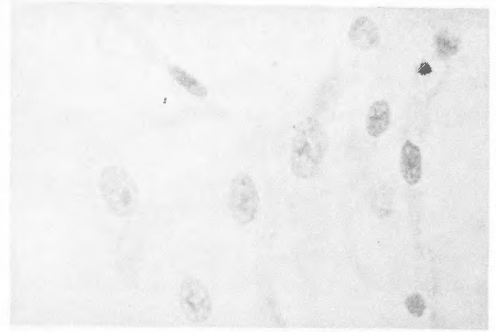
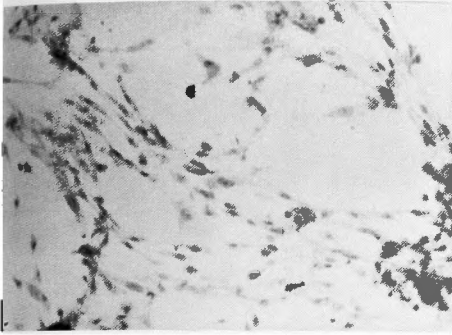


Fig. 13. 分離培養後3代39日目
No. 7. Giemsa染色 左: $\times 100$, 右: $\times 400$



Fig. 14. 分離培養後6代95日目
No. 7. Giemsa染色 $\times 400$

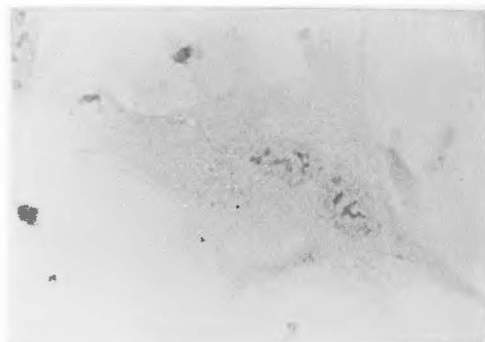


Fig. 15. 分離培養後9代160日目
No. 7. Giemsa染色 左: $\times 100$, 右: $\times 400$

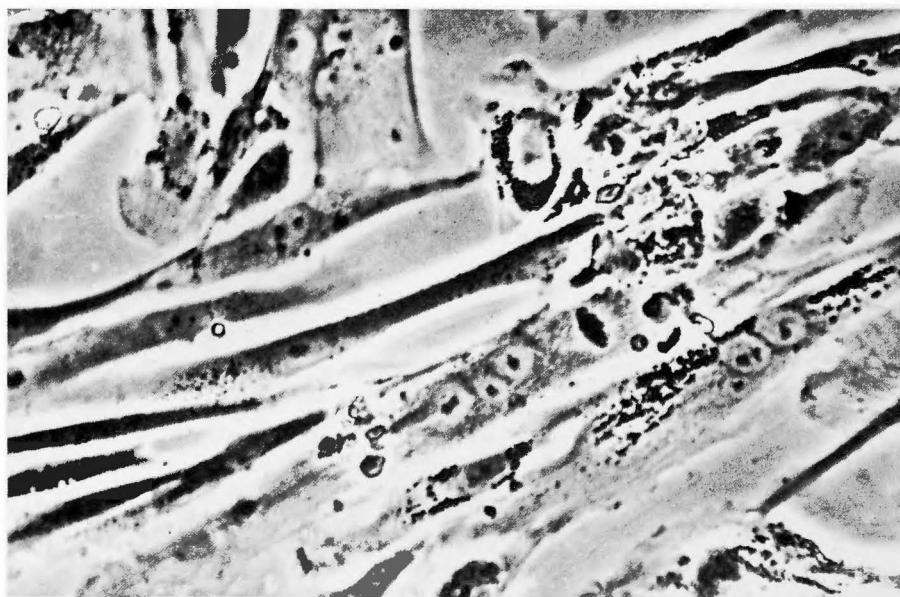


Fig. 16. 分離培養後12日目
No. 6. 位相差像 $\times 400$